

Dieci anni di pediatria: che cosa è cambiato nella genetica

GIOVANNI CORSELLO

Dipartimento Materno-Infantile, Università di Palermo

È cambiato molto. La pediatria di I e II livello è nella condizione (indispensabile) di saper di più dei geni e delle nuove possibilità diagnostiche in tema di malattie genetiche. Sia l'articolo che l'editoriale di accompagnamento richiamano alla professionalità affidata a Centri esperti anche in tema di consulenza genetica: ancora troppo pochi in Italia.

Il patrimonio genetico umano racchiuso nei 46 cromosomi è costituito da circa 25.000 geni attivi. Il DNA nucleare è un sistema molecolare estremamente dinamico che va incontro a processi di trascrizione, traduzione in proteine e duplicazione durante la divisione cellulare. Un meccanismo noto con il termine di "splicing alternativo" consente di riarrangiare i segmenti da trascrivere all'interno del gene (esoni) in modo da realizzare per ciascun gene diverse proteine; le proteine sintetizzate a partire dal DNA dell'uomo ammontano infatti a circa 100.000.

Durante i processi di trascrizione e di sintesi del DNA sono possibili e relativamente frequenti errori nei processi di lettura, noti come mutazioni. Nel corso dell'evoluzione le mutazioni sono state anche uno strumento di adattamento evolutivo delle diverse specie, e hanno contribuito a selezionare individui dotati di variazioni genetiche vantaggiose, in grado di resistere meglio all'ambiente. Mutazioni della sequenza di basi del DNA sono responsabili anche di difetti nella struttura di proteine che si manifestano come malattie ereditarie (oggi note come monogeniche) o come polimorfismi genici, il cui significato clinico è variabile: alcuni inducono suscettibilità allo sviluppo di malattie multifattoriali (autoimmuni e allergiche in primo

WHAT HAS CHANGED IN GENETICS IN THE LAST 10 YEARS

(Medico e Bambino 2006;25:359-364)

Key words

Clinical Genetics, Syndromes, Genetic counselling

Summary

The recent developments of genetics allow a clearer diagnosis of most of the syndromes and diseases due to defects of the genetic code and of the chromosomal pattern. New techniques such as FISH (Fluorescent in Situ Hybridization) and CGH-microarrays (Comparative Genomic Hybridization) may help to define those syndromes with submicroscopic abnormalities which cannot be diagnosed by standard cytogenetic analyses. In addition, such techniques may find subtelomeric rearrangements responsible for mental retardation and malformations with sporadic occurrence and without elements recalling any known syndrome (about 7% of severe mental retarded children show a telomeric defect). Syndromes with abnormalities of genetic mechanisms without mendelian inheritance may be diagnosed with DNA and cytogenetic procedures, showing for example defects of genomic imprinting, uniparental disomies, dynamic mutations with trinucleotid amplification. Prenatal diagnosis and therefore genetic counselling to couples and families may be influenced by the application of these new techniques

luogo); altri possono modificare la risposta dell'organismo a farmaci, metaboliti e nutrienti.

Gli errori di lettura e di sintesi del DNA possono insorgere in modo del tutto casuale durante la divisione cellulare oppure dipendere da fattori ambientali sia prima che dopo la nascita. Mutazioni possono insorgere nelle cellule germinali (sia nello spermatozoo che nell'ovocita) e quindi interessare la globalità delle cellule del nuovo organismo per essere trasmesse alla prole, ovvero insorgere in cellule somatiche ove non inducono alterazioni ere-

ditarie. Le mutazioni coinvolte nello sviluppo di tumori sono esempi di mutazioni somatiche che possono intervenire in seguito alla esposizione di specifici agenti mutageni.

LA CLASSIFICAZIONE DELLE MALATTIE GENETICHE

Le malattie genetiche possono essere classificate in modo diverso in rapporto alla tipologia e al livello in cui risiedono le alterazioni stesse. Possiamo infatti identificare:

INDICAZIONI ALL'ANALISI CITOGENETICA (SOCIETÀ ITALIANA DI GENETICA UMANA)

- Quadro clinico riconducibile a una sindrome cromosomica nota
- Anamnesi familiare positiva per riarrangiamento cromosomico
- Sospetto clinico di sindrome genomica da microdelezione/microduplicazione
- Sospetto di sindrome da instabilità cromosomica
- Ritardo mentale o storia familiare di ritardo mentale
- Anomalie congenite multiple
- Fenotipo dismorfico associato o meno a ritardo dello sviluppo
- Genitali ambigui
- Ipostaturalità
- Aborto o nato morto con quadro dismorfico/malformativo
- Amenorrea primaria, secondaria, menopausa precoce
- Infertilità
- Oligo-azoospermia
- Poliabortività
- Coppie candidate a fecondazione assistita
- Coppie con diagnosi prenatale di riarrangiamento cromosomico e/o varianti cromosomiche

Tabella I

SINDROMI MALFORMATIVE DA MICROALTERAZIONI CROMOSOMICHE DIAGNOSTICABILI CON TECNICA FISH

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| • VCGS (Microdelezione 22q11.2) | • Monosomia 22q13 |
| • Cri du chat | • Sindrome di Smith-Magenis |
| • Sindrome di Wolf-Hirschhorn | • Sindrome di Rubinstein-Taybi* |
| • Sindrome di Williams | • Sindrome di Sotos* |
| • Sindrome di Miller-Dieker | • Sindrome di Mowat-Wilson* |
| • Monosomia 1p36 | |

*Rubinstein-Taybi, Sotos, Mowat-Wilson: è necessario escludere una microdelezione prima di procedere con l'analisi mutazionale del gene specifico

Tabella II

1. Aberrazioni cromosomiche, in cui esiste una variazione del numero dei cromosomi (in eccesso o in difetto) oppure una alterazione strutturale di uno o più cromosomi, che comporta comunque una modifica del patrimonio genetico individuale.
2. Difetti monogenici, con meccanismo di trasmissione di tipo mendeliano, che segue cioè le leggi classiche della dominanza, della recessività e della trasmissione legata al cromosoma X.
3. Malattie multifattoriali, dovute cioè a una interazione tra predisposizione genetica (poligenica, legata cioè a un particolare assetto di più geni interagenti) e fattori ambientali che agiscono come elementi scatenanti.

Il rapporto tra cromosomi, geni e malattie viene oggi riconsiderato alla luce delle conoscenze acquisite con l'applicazione delle tecniche di indagini citogenetiche e molecolari.

LO STUDIO GENOTIPICO

La trasmissione ereditaria dei caratteri normali e patologici poteva un tempo essere studiata solo sulla base delle caratteristiche fenotipiche (connotati clinici, malformazioni, deficit di enzimi, ritardo mentale, difetti sensoriali, ritardi di crescita, anomalie dello sviluppo puberale ecc.). Oggi invece le alterazioni del patrimonio genetico possono essere studiate anche dal

punto di vista "genotipico", in modo molto più accurato ed efficace sul piano diagnostico, anche in epoca prenatale. La citogenetica classica con le attuali tecniche di bandeggio consente di identificare circa 550 bande diverse e ha delle indicazioni ormai ben standardizzate, espresse in *Tabella I*.

L'ibridazione in situ fluorescente

Le tecniche di citogenetica sono sempre più spesso integrate dalla FISH (ibridazione in situ fluorescente) che consente di identificare microdelezioni o microduplicazioni submicroscopiche alla base delle sindromi da geni contigui (*Tabella II e Box 1 e 2*) o delezioni delle regioni cromosomiche subtelomeriche, possibili cause di ritardo mentale, note dismorfiche e malformazioni^{1,2}.

Una significativa percentuale di soggetti con ritardo mentale grave (7% circa) presenta alterazioni dei telomeri³. L'identificazione precoce di un'alterazione cromosomica submicroscopica in questi soggetti è importante perché in qualche modo chiude e definisce la fase diagnostica di ricerca dell'eziologia e consente alla famiglia di seguire con maggiore finalizzazione il percorso evolutivo in termini di trattamenti abilitativi e di follow-up multidisciplinare⁴.

L'ibridazione genomica comparativa

Recentemente la messa a punto di una metodica nota come CGH (ibridazione genomica comparativa) ha aperto la strada alla identificazione di alterazioni quantitative del corredo cromosomico anche in assenza di una chiara suggestione diagnostica, come nel caso delle anomalie strutturali cromosomiche apparentemente bilanciate o di soggetti con ritardo mentale e patologia malformativa negativi alla FISH per locus noti e allo screening per riarrangiamenti subtelomeric⁵. La CGH è utile anche in soggetti con FISH patologica per locus noti, al fine di determinare l'estensione del tratto cromosomico coinvolto e per una più corretta correlazione cariotipo/fenotipo.

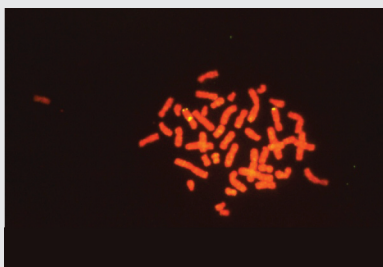
Le analisi molecolari

L'analisi molecolare del DNA oggi consente la diagnosi genotipica di sin-

Box 1 - SINDROME DI WILLIAMS**Delezione gene elastina 7q**

Diagnosi: FISH con presenza di un cromosoma 7 con due segnali e uno (il deleto) in cui manca il segnale nella zona sottocentromerica del braccio lungo del cromosoma 7.

Fenotipo: naso bulboso, labbra sporgenti, iride stellato, padiglioni auricolari a basso impianto, stenosi aortica so-pravalvolare, ritardo neuropsicomotorio di grado lieve, instabilità comportamentale.

**Box 2 - SINDROME DI RUBINSTEIN-TAYBI****Microdelezione 16p**

Ritardo psicomotorio e di crescita, ipertricosi, naso con setto spesso e più basso delle ali, slargamento o duplicazione del primo dito di mani e piedi con alterazioni ossee strutturali.



ne gametica per correzione anomala di trisomia, con conseguenze fenotipiche identiche a quelle delle alterazioni di imprinting). Una delle sindromi più note correlata con difetti di imprinting o con la presenza di disomia uniparentale è la sindrome di Prader-Willi (*Box 3*), dovuta ad alterazione del tratto cromosomico 15q13 di origine paterna, mentre la corrispondente alterazione a livello di allele materno è responsabile della sindrome di Angelman, caratterizzata da gravi disordini neurologici (ritardo mentale, convulsioni, atassia).

Questi processi di definizione e di stabilizzazione cromosomica nelle fasi finali della gametogenesi rientrano nell'ambito dell'epigenetica. Alterazioni epigenetiche possono essere determinate anche da fattori ambientali, quali l'infertilità e l'applicazione di tecniche di riproduzione medicalmente assistita. L'incidenza di sindromi con alterazioni dell'imprinting genomico (sindrome di Wiedemann-Beckwith e sindrome di Angelman in particolare) è infatti più elevata (con un RR di 4,2) nei nati con applicazione di metodiche di procreazione medicalmente assistita rispetto alla popolazione aperta (*Box 4 e Figura 1*)^{6,7}.

Meccanismi genetici noti da tempo come l'**anticipazione genica** (tendenza all'aumento della espressività clinica per gravità e precocità, con il passaggio generazionale) sono stati oggi chiariti sul piano genetico sulla base della identificazione di **mutazioni dinamiche**. Queste mutazioni sono caratterizzate da un'amplificazione del numero di triplette nucleotidiche a livello del gene responsabile. Quando il numero di triplette nucleotidiche supera una determinata soglia, diversa per ciascun gene e per ciascuna malattia, si innesca un processo di progressivo incremento con il passaggio generazionale, sino a quando il numero di triplette condiziona il blocco di trascrizione del gene e la conseguente induzione del fenotipo.

Lo studio molecolare del DNA ha anche consentito di identificare quadri clinici di dubbia interpretazione e definizione nosologica, quali le sindromi con craniosinostosi, oggi definite come sindromi da mutazioni dei geni che codificano per i recettori dei fattori di cre-

dromi malformative e malattie genetiche dovute a mutazioni mendeliane o a meccanismi molecolari sino a 10 anni fa poco noti, quali ad esempio l'**imprinting genomico** (espressione differenziata di geni in rapporto all'origi-

ne parentale e al tipo di segregazione gametica, in virtù di meccanismi quali la metilazione del DNA che inattiva il gene o l'acetilazione degli istoni che lo attiva), le **disomie uniparentali** (coppia di cromosomi di identica derivazio-

Aggiornamento

Box 3 - SINDROME DI PRADER-WILLI

Fenotipo: ipotonia neonatale, iperfagia/obesità, ipogonadismo, ritardo mentale, acromicria.



Meccanismi patogenetici: delezione 15q 11-13 paterna (70% dei casi); UPD 15 materna (15-20% dei casi); altri meccanismi (10-15%); alterazione del centro dell'imprinting.

PRINCIPALI MOTIVAZIONI DI RICHIESTA DI UNA CONSULENZA GENETICA

- Presenza nella famiglia di uno o più soggetti con una patologia genetica nota o con una patologia malformativa o neurologica non inquadrata
- Consapevolezza o sospetto di alterazioni genetiche fenotipicamente silenti (*portatore sano di mutazioni recessive, portatore di alterazioni strutturali bilanciate*)
- Poliabortività nella coppia o problemi di infertilità e sterilità
- Fattori di rischio anamnestico per malattie genetiche (*consanguineità, età materna o paterna avanzata*)

Tabella III

scita dei fibroblasti (FGFR)⁸. Mutazioni diverse di uno stesso gene possono determinare fenotipi diversi: mutazioni di FGFR1 e FGFR2 sono alla base di quadri interpretati come sindromi di Apert, Pfeiffer, Crouzon. Mutazioni diverse a carico del gene che codifica per FGFR3 possono determinare sindrome di Muenke (craniosinostosi coronale con brachidattilia da mutazione pro250arg), acondroplasia, displasia tanatofora o ipocondroplasia.

PREVENZIONE E IDENTIFICAZIONE PRECOCE DELLE MALATTIE GENETICHE

Lo sviluppo tecnologico applicato alle scienze biomediche ha notevolmente contribuito anche ai progressi recentemente ottenuti nel campo della prevenzione e della identificazione precoce delle malattie genetiche.

Il momento fondamentale di ogni intervento di prevenzione è rappresentato dalla **consulenza genetica** offerta

alla famiglia che deve spesso affrontare decisioni impegnative e difficili, per cui si impongono informazione adeguata e consapevolezza.

La domanda di consulenza genetica nella popolazione odierna è certamente in sensibile aumento⁹. Ciò in parte è dovuto alla sensibilizzazione avviata dai mass-media e dal fatto che il numero delle patologie genetiche conosciute e diagnosticabili a livello genotipico è notevolmente cresciuto. I motivi che inducono oggi a richiedere una consulenza genetica sono numerosi e sono riassunti nella *Tabella III*.

È comunque la nascita di un neonato con una malattia genetica che costituisce il momento di avvio di un complesso iter diagnostico indirizzato verso l'inquadramento nosologico. Anamnesi accurata, analisi del fenotipo e diagnostica orientata sono gli elementi di maggior rilievo in questo percorso diagnostico che riguarda tutte le classi di malattie genetiche.

Nel caso di malattie ereditarie a tra-

missione mendeliana (autosomica dominante, autosomica recessiva, X-linked), il calcolo del rischio di insorgenza o di ricorrenza nella prole è semplice e deve essere illustrato alla famiglia insieme con le prospettive di trattamento specifico, recupero funzionale, riabilitazione, e con le possibilità di diagnosi preconcezionale o prenatale.

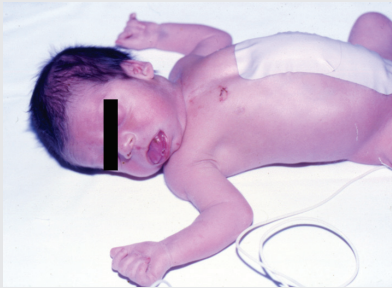
Alcune malattie genetiche ereditarie mostrano una eterogeneità eziologica (determinata da molteplicità di fattori genetici e ambientali interagenti) e genetica (intervento di meccanismi diversi). In questi casi è spesso arduo formulare un rischio di ricorrenza preciso alla famiglia in sede di consulenza. L'individuazione di nuovi meccanismi genetici (disomia uniparentale, imprinting, amplificazione) rappresenta un ulteriore contributo non solo sul piano diagnostico ma anche preventivo, per le possibili applicazioni in ambito di diagnosi prenatale¹⁰.

I servizi di consulenza genetica sono oggi una realtà sempre più rappresentata nei Paesi occidentali. Il loro numero è aumentato enormemente negli ultimi 30 anni, parallelamente al crescere della domanda di consiglio genetico, sebbene in Paesi come l'Italia e in regioni come la Sicilia esso risulti ancora del tutto insufficiente rispetto ai bisogni di salute e di prevenzione. Alcuni fattori hanno certamente contribuito a questo fenomeno: il miglioramento delle tecniche di indagine citogenetica e molecolare del DNA, l'innalzamento dell'età media di procreazione nei Paesi occidentali, la maggiore richiesta e informazione nella società e la disponibilità di diagnosi prenatale sempre più precisa e affidabile.

La consulenza genetica si basa essenzialmente su un rapporto di comunicazione, informazione e supporto della famiglia, in modo da metterla in condizioni di effettuare le proprie scelte in piena libertà e consapevolezza.

La consulenza genetica è, quindi, un processo di istruzione e informazione che ha per oggetto il rischio di manifestarsi o di ricorrere di una patologia nelle famiglie e le implicazioni diagnostiche, prognostiche e terapeutiche.

A tal fine è necessario che il consulente sia in possesso degli strumenti in-

Box 4 - SINDROME DI WIEDEMANN-BECKWITH**Locus - 11p15**

Macrosomia, visceromegalia, macroglossia, ipotonia, ipoglicemia neonatale, onfalocele/ernia ombelicale, predisposizione al tumore di Wilms e altre neoplasie addominali.

dispensabili per fornire un adeguato consiglio genetico: una diagnosi certa (qualora sia presente un caso indice) e una buona conoscenza delle implicazioni prognostiche e terapeutiche, del modello di trasmissione della malattia e delle opportunità di diagnosi prenatale.

Nel caso di una coppia che abbia già un figlio affetto da patologia malformativa o genetica, il primo e fondamentale punto di partenza è la corretta formulazione della diagnosi. Ciò avviene sia attraverso un'attenta analisi del fenotipo che attraverso specifiche indagini diagnostiche (citogenetiche, molecolari del DNA, radiologiche, ematochimiche, biochimiche). Risulta evidente, quindi, che la consulenza genetica deve essere offerta solo da quelle strutture che sono anche in grado di offrire gli strumenti diagnostici necessari per una diagnosi accurata. Lo studio diagnostico va eseguito con il massimo della completezza possibile anche nei casi non vitali, attraverso lo studio autoptico e molecolare, per porre le basi di una successiva consulenza alla famiglia.

Nel caso di patologie a trasmissione mendeliana classica (autosomica dominante, autosomica recessiva, X-linked) il calcolo del rischio di insorgenza nella prole deve essere illustrato alla famiglia insieme con le prospettive di trattamento specifico, di recupero funzionale, e con le possibilità di diagnosi preconcezionale o prenatale. Talvolta, però, la patologia diagnosticata mostra una eterogeneità eziologica (determinata da fattori ambientali e/o fattori genetici) o una eterogeneità genetica (determinata da due o più diversi meccanismi genetici) e non è possibile formulare un rischio di ricorrenza secondo i modelli classici. In tali casi ci si può avvalere di metodi empirici meno precisi, quali il rischio di ricorrenza in una data popolazione o a una determinata età della madre al concepimento. Con il passare degli anni il rapido incremento delle nostre conoscenze ha consentito di svelare alcuni meccanismi di trasmissione delle malattie genetiche (disomia uniparentale, imprinting, amplificazione e metilazione delle triplette) e così limitare sempre più il numero di condizioni nelle quali non è possibile offrire un consiglio genetico preciso.

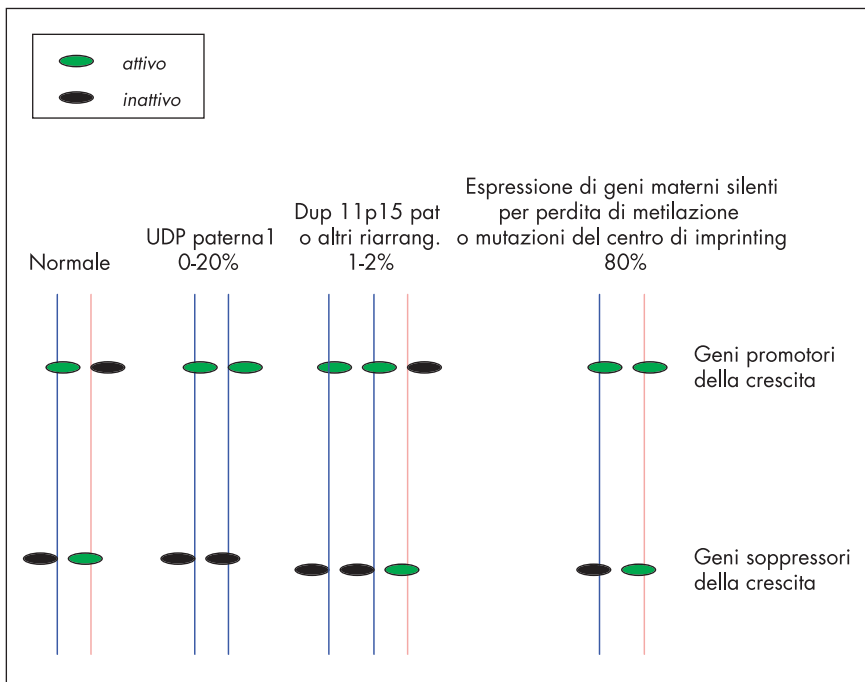


Figura 1. Modello schematico di dosaggio genico nella sindrome di Wiedemann-Beckwith in rapporto ai diversi meccanismi patogenetici molecolari che causano una doppia espressione di geni che promuovono la crescita.

PRINCIPALI FATTORI DI RISCHIO DI MALFORMAZIONI NEL PRODOTTO DEL CONCEPIMENTO ED ESEMPI DI PATOLOGIE CORRELATE

• Fattori anamnestici

Età materna avanzata (> 35 anni)	Malattie cromosomiche
Età paterna avanzata (>45 anni)	Nuove mutazioni autosomiche dominanti
Consanguineità dei genitori	Malattie autosomiche recessive
Ricorrenza verticale (+ generazioni)	Trasmissione autosomica dominante
Ricorrenza orizzontale (fratria)	Trasmissione autosomica recessiva
Poliabortività, plurinatività	Anomalie cromosomiche, malattie recessive letali

• Fattori gestazionali

Esposizione a teratogeni - Chimici (farmaci, inquinanti ambientali, sostanze d'abuso, metaboliti) - Fisici (radiazioni ionizzanti, ipertermia) - Biologici (agenti TORCH, varicella, Parvovirus B19, lue ...)	Embriofetopatie (Disruptions)
Ritardo di crescita intrauterino	Sindromi a determinismo genetico
Gemellarità	Difetti della blastogenesi (linea mediana) Sequenze twin-twin (vascolari)
Oligo-anidramnios	Sequenze da rottura precoce dell'amnios, di Potter, di Prune-Belly
Riproduzione artificiale (ICSI)	Anomalie cromosomi sessuali, difetti epigenetici

Tabella IV

Esistono, inoltre, numerose situazioni in cui è utile una consulenza genetica in assenza di soggetti malati nella famiglia e quindi di una diagnosi di riferimento. La consanguineità dei genitori è, ad esempio, un motivo di consultazione genetica da parte della coppia. È noto infatti che essa aumenta in modo significativo il rischio di malattie autosomiche recessive nella prole, per la maggiore probabilità che due consanguinei hanno rispetto alla popolazione aperta di essere eterozigoti per uno stesso carattere recessivo. Ciò è tanto più rilevante quanto minore è la frequenza del gene nella popolazione. L'età materna avanzata al concepimento è da tempo riconosciuta come uno dei fattori più importanti nel determinare il rischio di insorgenza di sindrome di Down e di altre aberrazioni cromosomiche. Ciò sembra essere legato a numerosi fattori quali l'invecchiamento degli ovociti e la maggiore frequenza di errori (non disgiunzioni, rotture ecc.) durante le divisioni meiotiche. La poliabortività è un altro motivo per cui è spesso richiesta la consulenza genetica da parte delle coppie o dei medici ginecologi interessati al problema. Al di là delle problematiche ginecologiche, immunologiche e infetti-

ve, vi è infatti la possibilità che aberrazioni cromosomiche bilanciate in uno dei partner diventino sbilanciate nel prodotto del concepimento, rendendolo non vitale.

Uno degli obiettivi più frequentemente richiesti in occasione di consulenza genetica è quello di offrire la diagnosi prenatale alle coppie con presenza di uno o più fattori di rischio per malattie genetiche o per patologia malformativa (Tabella IV)¹¹. La diagnosi prenatale è infatti in molti casi l'unica opportunità di prevenzione oggi proponibile in molte di queste coppie o famiglie a rischio di patologia cromosomica o genetica nella prole, verso cui non esistono ancora prospettive terapeutiche efficaci e sicure in grado di modificarne la storia naturale.

Indirizzo per corrispondenza:

Giovanni Corsello
e-mail: giocors@aliceposta.it

Bibliografia

- Sanlaville D, Lapiere JM, Turleau C, et al. Molecular karyotyping in human constitutional cytogenetics. *Eur J Med Genet* 2005;48:214-31.
- Vermeesch JR. From chromosomes to molecular karyotyping. *Eur J Med Genet* 2005;48:211-3.

MESSAGGI CHIAVE

❑ La genetica medica è una disciplina che sempre più spesso consente oggi l'identificazione delle malattie genetiche non più solo sul piano delle manifestazioni cliniche o biochimiche, ma anche sul piano delle alterazioni quantitative o qualitative del patrimonio genetico.

❑ Le indagini genetiche applicabili sono numerose e spaziano da quelle di citogenetica molecolare (FISH e CGH) a quelle di analisi diretta del DNA (PCR, sequenziamento genico).

❑ Numerosi meccanismi responsabili di alterazioni genetiche (imprinting genomico, disomia uniparentale, microalterazioni cromosomiche, mutazioni dinamiche con amplificazioni di triplette, anticipazione genica, polimorfismi in grado di modificare l'espressione genica) sono oggi suscettibili di identificazione e di utilizzazione anche a livello diagnostico.

❑ La consulenza genetica, tesa alla formulazione del rischio di manifestarsi o di ricorrere di una malattia genetica in famiglie o coppie a rischio, non può prescindere dalla conoscenza e dalla utilizzazione di test genetici aggiornati.

- de Vries BBA, White SM, Knight SJL, et al. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements. A checklist. *J Med Genet* 2001;38:145-50.
- Mao R, Pevsner J. The use of genomic microarrays to study chromosomal abnormalities in mental retardation. *MRDD Research Reviews* 2005;11:279-85.
- Vissers LELM, Veltman JA, van Kessel G, Brunner HG. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Hum Mol Genet* 2005;14:R251-R223.
- Lambert RD. Safety issues in assisted reproductive technology: aetiology of health problems in singleton ART babies. *Hum Reprod* 2003;18:1987-91.
- Schieve LA, Rasmussen SA, Buck GM, Schendel DE, Reynolds MA, Wright VC. Are children born after assisted reproductive technology at increased risk for adverse health outcomes? *Obstet & Gynecol* 2004;103:1154-63.
- Mooney MP, Siegel MI. Understanding craniofacial anomalies. New York: Wiley, 2002.
- Baty BJ, Baker DL (Eds). Seminars in Medical Genetics. The evolving practice of genetic counseling. *Am J Med Genet* 2001;106:175-240.
- Hogge WA, Surti U, Kochmar SJ, Mowery-Rushton P, Cumbie K. Molecular cytogenetics: an essential component of modern prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:352-7.
- Brock DJH, Rodeck CH, Ferguson-Smith MA. Prenatal diagnosis and screening. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1992.